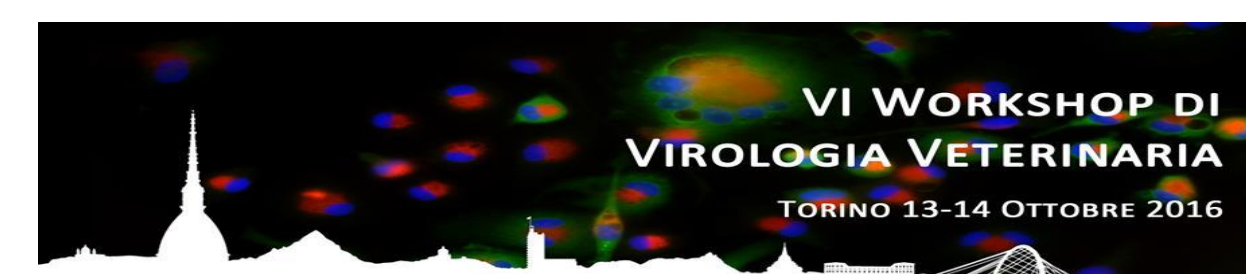




Effetto nutraceutico dei beta-glucani su api infette da Deformed Wing Virus (DWV)

Maurizio Mazzei¹, Baldassare Fronte¹, Simona Sagona¹, Maria Luisa Carrozza², Mario Forzan¹, Federica Pizzurro¹, Carlo Bibbiani¹, Vincenzo Miragliotta¹, Francesca Abramo¹, Francesca Millanta¹, Marco Bagliacca¹, Alessandro Poli¹, Antonio Felicioli¹

1) Dipartimento di Scienze Veterinarie. Università di Pisa 2) Scuola Normale Superiore, Pisa



INTRODUZIONE

Il Deformed Wing Virus (DWV) o virus delle api deformi è responsabile di una infezione, spesso in forma subclinica, molto diffusa nell'*Apis mellifera*. Il virus appartiene alla famiglia *Picornavirales* e, come gli altri membri della famiglia, è caratterizzato da un virione nudo di piccole dimensioni con genoma a ssRNA (+). Il virus infetta le forme larvali durante il loro sviluppo e l'infezione si manifesta con la comparsa di api neo-sfarfallate con gravi deformazioni a carico delle ali, ridotte dimensioni del corpo, incapacità di volare e ridotta aspettativa di vita (Fig.1a). La malattia, in stretta associazione con infestazioni di *Varroa destructor*, un acaro che agisce sia come parassita che come amplificatore e vettore biologico del virus, può portare al collasso della intera colonia (Fig.1b). Le api, così come altri invertebrati, hanno sviluppato un'ampia varietà di meccanismi di difesa innata contro i vari agenti patogeni, seppur in assenza di un sistema immunitario adattativo. In molti dei meccanismi immuno-difensivi degli invertebrati sono coinvolte proteine secrete da cellule dell'emolinfia dotate di attività opsonizzante, chemiotattica, battericida e perossidasi. Tali meccanismi possono essere modulati dalla presenza di varie molecole definite immuno-modulatori. Tra queste i β -glucani, polisaccaridi ramificati non amidacei costituiti da molecole di glucosio unite insieme mediante legami glicosidici $\beta(1,3)$ e $\beta(1,6)$ (Fig.1c), possono rappresentare una alternativa all'utilizzo di sostanze di sintesi chimica. I β -glucani sono costituenti della parte solubile della fibra vegetale e sono presenti in molti cereali ma anche nelle pareti cellulari di vari agenti patogeni. Al fine di comprendere se i β -glucani possano avere una efficace azione immuno-modulante sulle api, la molecola, in diverse concentrazioni, è stata integrata nell'alimentazione di gruppi sperimentali di api in un modello di infezione naturale e sperimentale con DWV. Carica virale e sopravvivenza sono stati misurati e comparati in gruppi trattati e gruppi controllo.

MATERIALI & METODI

Api, dieta e disegno sperimentale: un totale di 810 api neo-sfarfallate (*Apis mellifera ligustica* L.) sono state prelevate da un apiario *Varroa-free* locato nell'isola di Gorgona (LI) e divise in un totale di 25 gabbiette ognuna contenente un massimo di 30 api. L'esperimento è stato condotto suddividendo le api in 4 coorti: 'Y' (n=90), 'A' (n=270), 'B' (n=270) and 'C' (n=180). Ogni coorte è stata ulteriormente divisa in 3 gruppi sperimentali a seconda dell'alimentazione ricevuta. Api appartenenti ai gruppi Y, A₀, B₀ e C₀ sono state alimentate con una soluzione zuccherina commerciale (Fruttosweet 45, A.D.E.A.). Api appartenenti ai gruppi A_{0.5}, B_{0.5}, C_{0.5} e A₂, B₂, C₂ a partire dal giorno 3 sono state nutrite con la stessa soluzione zuccherina con aggiunta di 0.5% o 2% (w/w) 1,3-1,6 β -glucano (MacroGard®, Biorigin®, Brasile) (Fig.2). Le api sono state allevate per 13 giorni a 28°C, le api appartenenti al gruppo Y sono state sacrificate al terzo giorno al fine di monitorare la presenza di DWV.

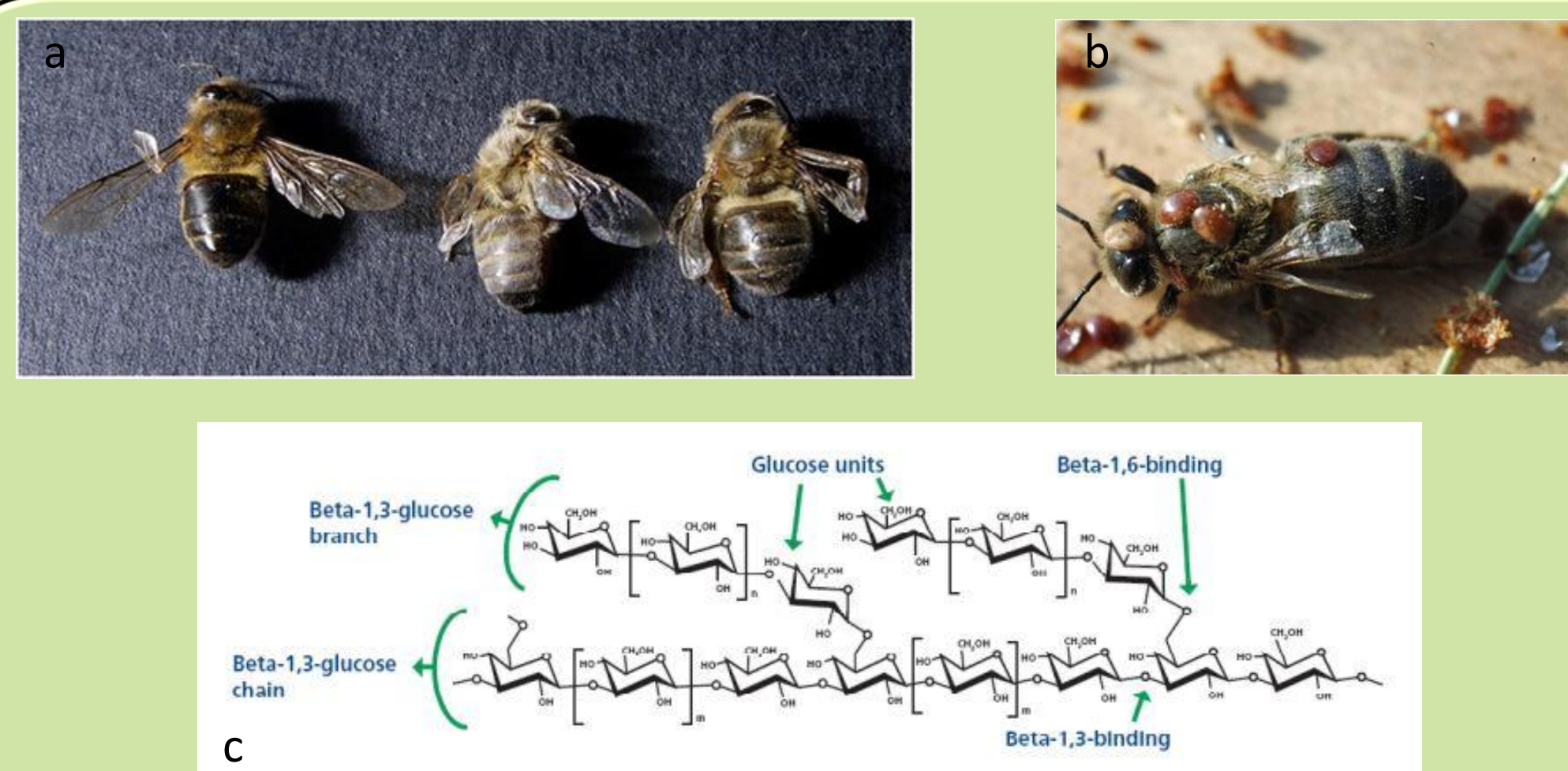


Fig.1 a) api con ali normali e con ali deformi; b) ape con *Varroa*; c) formula di struttura di 1,3-1,6 β -glucano

Infezione sperimentale e quantizzazione della carica virale: il sesto giorno, previa anestesia tramite CO₂, le api della coorte B sono state sottoposte ad infezione nell'emolinfia tramite iniezione nel tessuto intersegmentale tra capo e torace di 2.5 μ l di una soluzione contenente 1x10⁵ copie di DWV in PBS pH 7.2 (Fig.3 e Fig.4). Le api della coorte C hanno subito il medesimo trattamento ma iniettate solo con PBS pH 7.2. Le api della coorte A nonostante non abbiano subito nessuna iniezione sono state ugualmente sottoposte ad anestesia con CO₂. Alla conclusione dell'esperimento, l'RNA totale è stato estratto dai tessuti omogeneizzati di testa e addome ed eluito in 30 μ l RNase-free H₂O (RNeasy mini Kit Qiagen). L'RNA è stato quantizzato con il RiboGreen RNA Quantitation Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 10 μ l di ogni campione sono stati usati per calcolare la carica virale tramite RT-qPCR. I risultati sono espressi come numero di copie di RNA virale/ μ g RNA totale.

Analisi del tasso di sopravvivenza: al fine di comprendere se l'assunzione di 1,3-1,6 β -glucano possa avere un effetto sulla sopravvivenza delle api sottoposte ad infezione naturale e/o sperimentale, le api morte durante l'esperimento sono state raccolte ogni giorno e la percentuale di sopravvivenza calcolata per ogni gruppo.

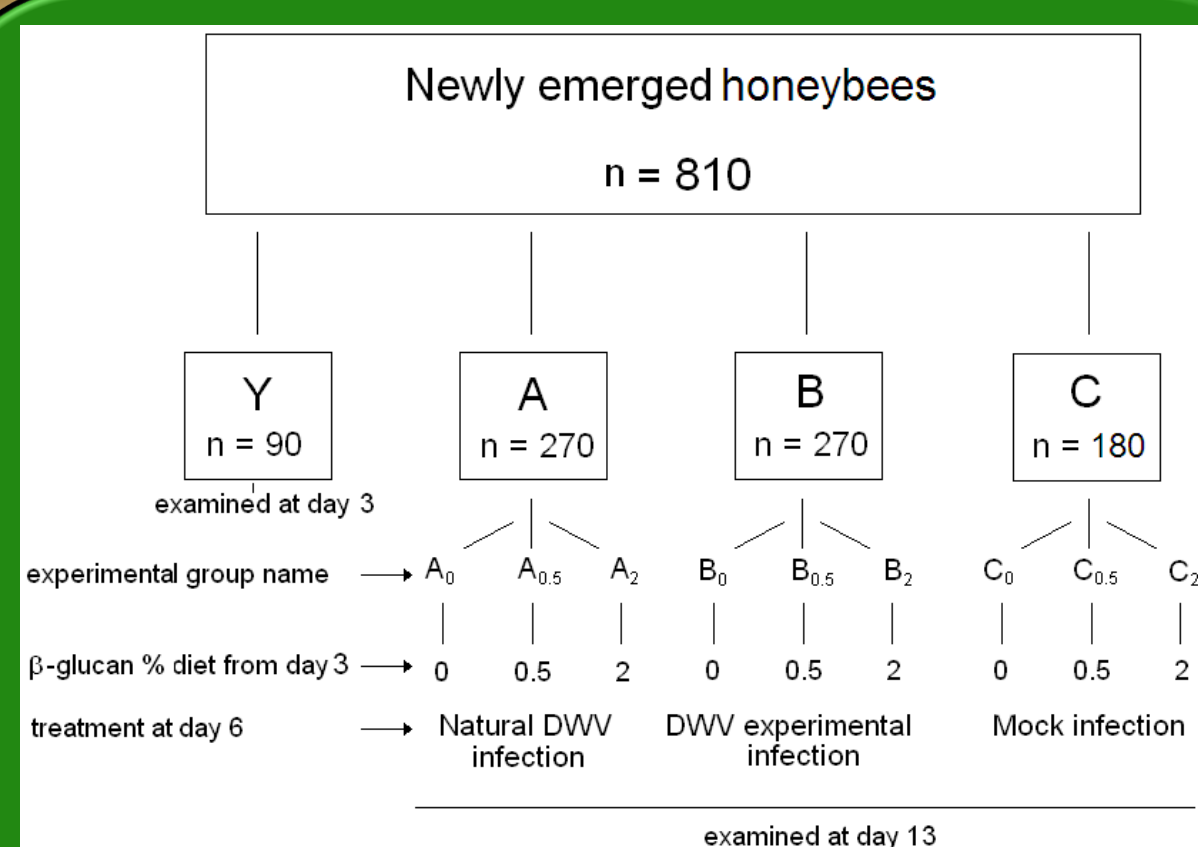


Fig. 2 Disegno sperimentale con coorti e gruppi

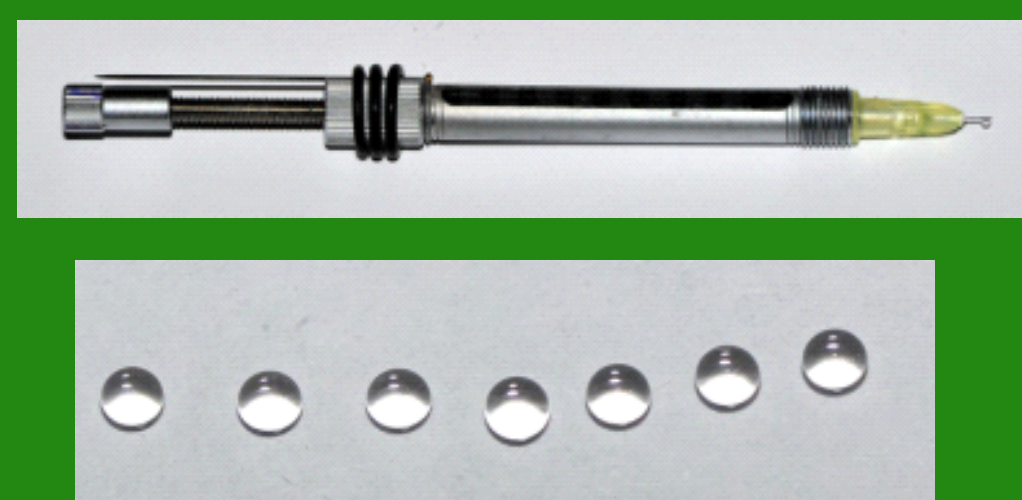


Fig. 3 Strumentazione utilizzata per le iniezioni delle api



Fig. 4 Procedura di Iniezione

RISULTATI

Effetto del 1,3-1,6 β -glucano su api infette con DWV: i risultati ottenuti indicano che la somministrazione di 0,5% e 2% β -glucano in api naturalmente infette (coorte A) coincide con una diminuzione del numero di api infettate ed una rilevante riduzione della carica virale soprattutto nella testa (Fig. 5). Questo dato potrebbe indicare che il β -glucano possa avere un effetto sull'aumento delle attività immunitarie dell'ape riducendo la replicazione virale e conseguentemente bloccando la diffusione del virus dall'addome alla testa. Le api infettate sperimentalmente (coorte B) nonostante la elevata carica virale mostrano un trend simile a quanto osservato in A, ma gli effetti sono maggiormente evidenti in api alimentate con 2% β -glucano. Api della coorte C non differiscono sostanzialmente dalla coorte A (Fig 5).

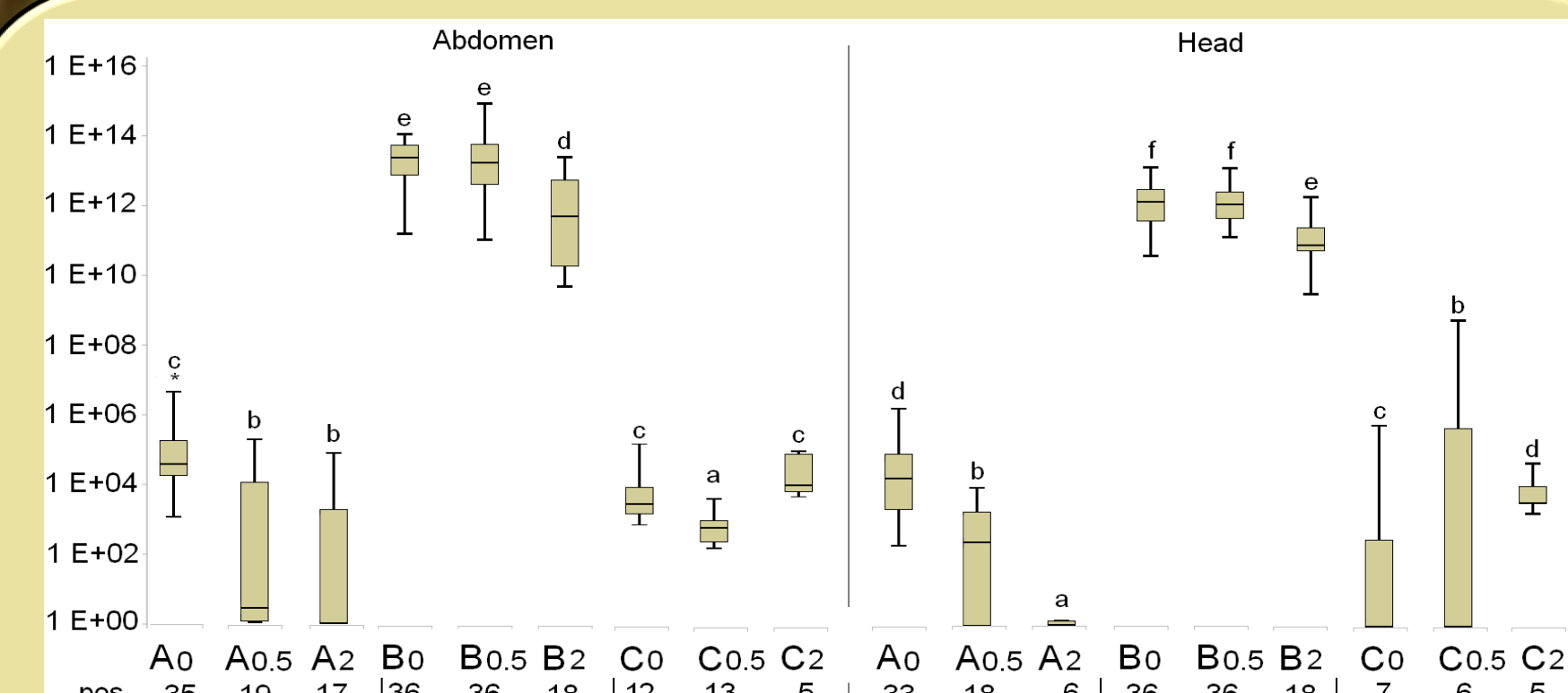


Fig.5 Grafico rappresentante le cariche virali ed il numero di api positive e negative dei diversi gruppi

Effetto del 1,3-1,6 β -glucano sulla sopravvivenza di api infette con DWV: l'assunzione di 0,5% β -glucano in api naturalmente infette (A_{0.5} e C_{0.5}) risulta associata con il maggiore tasso di sopravvivenza tra le rispettive coorti ed i gruppi sperimentali. In contrasto, l'assunzione di 2% β -glucano da parte di api sperimentalmente infette (coorte B) è coincisa con il più basso tasso di sopravvivenza. Questo risultato non sembra essere dovuto soltanto all'alta carica virale visto che le api delle coorti B₀ e B_{0.5} avevano un simile tasso di sopravvivenza di quelle dei gruppi A₀ e A₂ nei quali la carica virale era almeno dieci volte più bassa (Fig.6). E' speculabile che l'assunzione di β -glucano al 2% in presenza di una alta carica virale possa coincidere con una eccessiva attivazione del sistema immunitario con conseguente effetto negativo sulla sopravvivenza delle api.

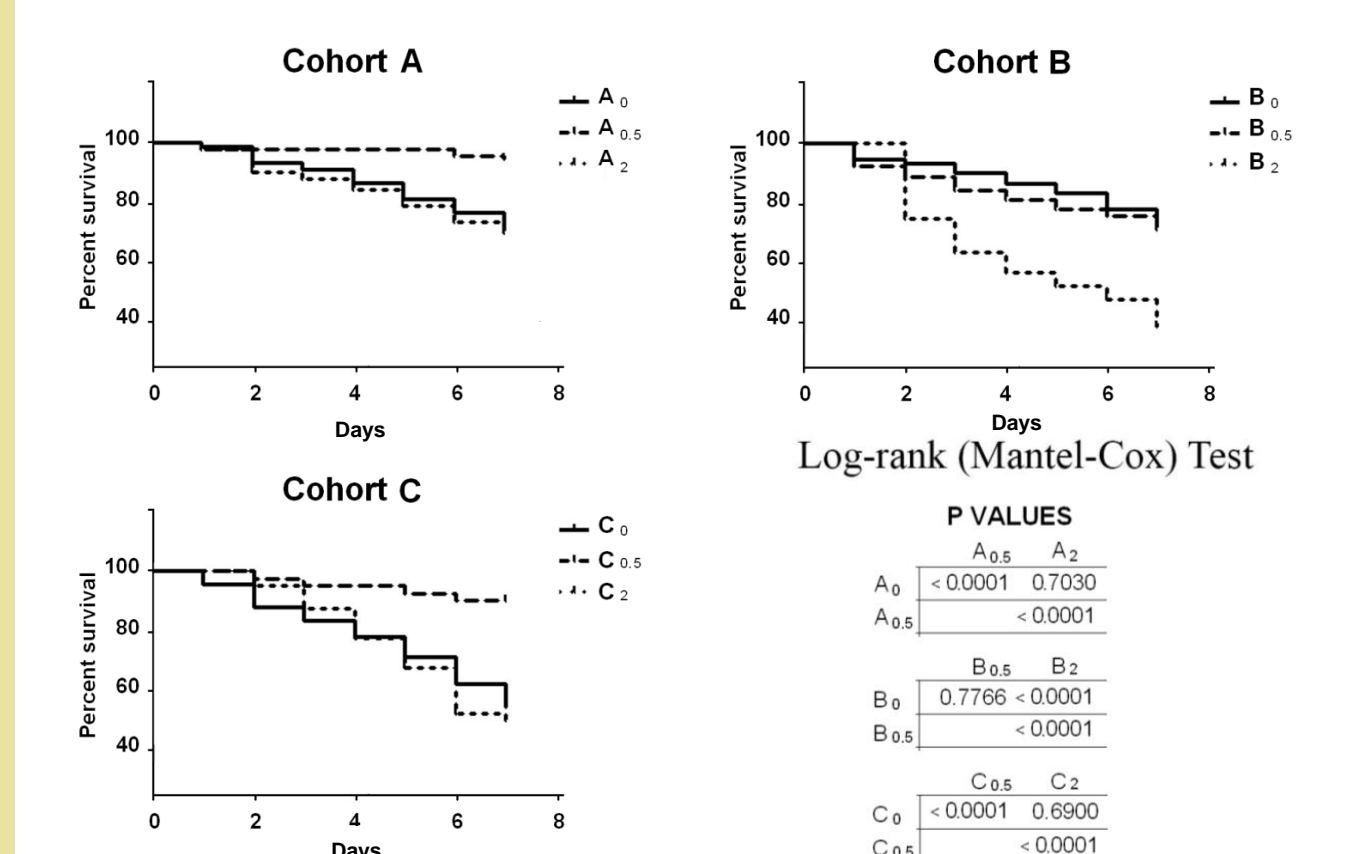


Fig.6 Grafico rappresentante la sopravvivenza delle coorti e dei gruppi

CONCLUSIONI

I nostri risultati indicano che la somministrazione orale di 0.5% β -glucano in api neo-sfarfallate naturalmente infettate con DWV coincide con una ridotta replicazione virale ed un aumento della sopravvivenza.

Il presente lavoro è stato realizzato grazie al fondo per la ricerca PRA 2015 dell'Università di Pisa